Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Prof. Dr. med. Heinz Spiess

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE DIFFERENZIERUNG DER GRANULOZYTEN IM BLUT NEUGEBORENER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Drewes, Anna Elisabeth
aus
Neubiberg
1984

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Prof. Dr. med. Heinz Spiess

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE DIFFERENZIERUNG DER GRANULOZYTEN IM BLUT NEUGEBORENER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Drewes Anna Elisabeth
aus
Neubiberg
1984

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. J. Suschke
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. H. Spiess
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 1984

D A N K

Herrn Prof. Dr. med. J. Suschke danke ich besonders für die Überlassung des Themas, für seine unkonventionelle, freundliche, wertvolle Beratung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.
Herrn Prof. Dr. med. H. Spiess danke ich für die Genehmigung, die Arbeit an der Kinderpoliklinik durchführung zu dürfen.

Ebenfalls gilt mein Dank den Hebammen und diensthabenden Ärzten im Kreissaal der I. Universitätsfrauenklinik sowie Frau Dr. Gräßl und Frau Dr. Tichmann für ihre aktive Kooperation.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Noss, der mir bei der Durchführung der Arbeit stets behilflich war.

Frau Dr. Besserer vom Institut für Statistik und Biomathematik der Universität München danke ich für ihre Unterstützung bei der Statistik.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546814_0009

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
	1. Versuch einer Definition	2
	2. Erreger	2
	3. Symptome	2
	4. Veränderung der neutrophilen polymorphkernigen Granulozyten (PMN) im Verlauf einer Sepsis	4
II.	PROBLEMSTELLUNG	5
III.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	6
	1. Sammeln und Erstellen der Blutausstriche	6
	1.1 Material	6
	1.2 Methode	7
	1.3 Allgemeine Beschreibung des PIC-gefärbten Blutausstrichs unter dem Mikroskop	8
	2. Klinischer Verlauf	9
	3. Ergebnisse	10
	3.1 Neugeborene mit Infektion/Sepsis	11
	3.2 Neugeborene ohne Infektion/Sepsis	12
	3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	16
	4. Auswertung der Ergebnisse	17
	Statistische Berechnungen	21
	4.1 Vergleich der Differentialzellbilder von infizierten Neugeborenen mit Neugeborenen ohne Infektion	23
	4.2 Vergleich der Differentialzellbilder Neugeborener nach vorzeitigem Blasensprung mit Neugeborenen ohne vorzeitigen Blasensprung	26

4.3 Vergleich der Differentialzellbilder von Neugeborenen mit niedrigem Apgarwert und Neugeborenen mit gutem Apgarwert 27
4.4 Vergleich der Differentialzellbilder von Geburten per sectio caesarea oder Vakuum mit Spontangeburten 28
4.5 Vergleich der Differentialzellbilder von weiblichen mit männlichen Neugeborenen 29
4.6 Vergleich der Differentialzellbilder von Neugeborenen mit vorzeitigem Blasensprung und niedrigem Apgar mit Neugeborenen ohne diese Kombination 30
4.7 Vergleich der Differentialzellbilder nach Geburtsgewichtsklassen 31
5. Fehler 32
5.1 Zufälliger Fehler 32
5.2 Systematischer Fehler 32

IV. DISKUSSION 33

V. MÖGLICHER STELLENWERT DER DIFFERENTIALZELLBILDER BEI DER ÜBERWACHUNG NEUGEBORENER 35
1. Differentialdiagnose Infektion/keine Infektion 35
2. Vorteile der Methode "Differentialzellbilder" 36
3. Nachteile der Methode 36

VI. ZUSAMMENFASSUNG 37

VII. LITERATUR 38

I. EINLEITUNG

Für den Perinatologen ist es derzeit schwierig, zum Zeitpunkt der Geburt sicher zu erkennen, ob ein Neugeborenes eine Infektion hat. Er ist im wesentlichen auf klinische Parameter angewiesen [1,2,5,6]. Labordaten können nur im Gesamtzusammenhang bewertet werden; sie sind nicht beweisend (siehe S. 3 ff) bzw. kommen zu spät (bakteriologische Befunde).

So sind beispielsweise Fälle von B-Streptokokken Sepsis beschrieben worden [3], deren Verlauf zwischen Auftreten erster Infektionssymptome und Tod durch Sepsis foudroyant innerhalb von Stunden verliefen, da das Neugeborene und insbesondere das Frühgeborene noch nicht in der Lage ist, die Infektion lokal zu begrenzen. Der Übergang zwischen Infektion und beginnender Sepsis ist also fließend.

Noch heute ist die Sepsis besonders bei Frühgeborenen eine Erkrankung mit hoher Mortalität [1,2,3]. Die Letalität bei Sepsis im Kindesalter liegt bei 13 bis 45 %, die der Frühgeborenen bei 61 % [2]. Der prozentuale Anteil der Sepsis an der Gesamtsterblichkeit ist seit 1966 erheblich gestiegen [2].

Mit der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen mit der Fluoreszenzfärbemethode von Suschke et al. [13,14,15] fortgesetzt, hier speziell unter dem Aspekt der Früherkennung einer Infektion.

1. Versuch einer Definition:

Sepsis ist eine Erkrankung, bei der dauernd oder schubweise Keime aus einem Herd ins Blut gelangen. Eintrittspforten sind beim Neugeborenen Haut, Schleimhäute, Lunge oder lokale Entzündungen wie z.B. Nabelinfektionen. Die Folgen der Herdbildung bestimmen das Krankheitsbild, nicht der örtliche Prozeß. Der Sepsisherd entsteht häufig als sekundäre metastatische Organabsiedelung infolge einer Bakteriämie. Entscheidend für den Krankheitsverlauf sind Wirkungen durch Exo- und Endotoxine [4], die z.B. zur Freisetzung lysosomaler Enzyme und Gerinnungsstörungen führen[2,8,9].

2. Erreger:

Häufigste Erreger der Neugeborenen-Sepsis sind die gramnegativen Keime[2]: E. coli, Pyocyaneus, gefolgt von Staphylokokken, ß-hämolysierende Streptokokken und seltener Pneumokokken, Meningokokken, Salmonellen und Enterobacter. Es gibt keinen Keim, der nicht einmal eine Sepsis verursachen könnte [4]. Der Erregernachweis gelingt allerdings nur zu ca. 73 % [2].

3. Symptome:

Genannt werden alle Symptome, die bei einer Neugeborenen-Sepsis vorkommen können, von denen im Einzelfall aber nur einige beobachtet werden.

Klinische Symptome [5]:

- Hautkoloritveränderungen (grün-grau-schmutzig),
- Störungen der Mikrozirkulation (marmorierte Haut, über mehrere Sekunden erkennbare anämische Bezirke nach Druck auf die Haut),
- Hypotonie der Muskulatur (Verminderung von Tonus und Spontanmotorik),
- Bradykardien (< 80/min),
- Apnoen ($\geq$ 20 sec.)
- Lebervergrößerungen (> 2 cm unter RB)
- gastrointestinale Symptome (Erbrechen, Durchfall, gespanntes oder gerötetes Abdomen).

Laborparameter [5,6]:

- Azidose (pH < 7,35),
- Leukozytose,
- Leukozytopenie,
- Linksverschiebung im Differentialblut (15 bis 25 % Stabkernige),
- Thrombozytopenie (< 100.000/mm^3),
- CRP positiv (> 0,8 mg/100 ml)
- BKS $\geq$ 15 mm nach 1 Stunde [6],
- Latex Haptoglobin positiv (> 25 mg/100 ml)[6],
- (Blutkultur; die positive Blutkultur ist derzeit als Beweis einer Sepsis umstritten. Das Spektrum der differentialdiagnostischen Möglichkeiten umfaßt Verunreinigungen sowie Formen transitorischer und persistierender Bakteriämien. [17] Andererseits fehlt in 27 % aller Fälle ein Erregernachweis [2].

4. Veränderung der neutrophilen polymorphkernigen Granulozyten (PMN) im Verlauf einer Infektion:

Zu den bisher bekannten Funktionen der Granulozyten im Verlauf einer bakteriellen Infektion gehören die Fähigkeiten zur Chemotaxis und Phagozytose. Letztere erfolgt je nach Aufbereitung des Bakteriums unterschiedlich [7]:

Bei der membrangebundenen Bakterizidie werden nach der Anheftung eines IgM-opsonierten Bakteriums an den Granulozyten bakterizide Stoffe, wie z.B. Myeloperoxidase, durch die Zellmembran sezerniert. Die Ingestion ist gekennzeichnet durch eine vollständige Aufnahme des von Antikörpern ummantelten Bakteriums in den Phygozyten, der seine Zellmembran zur Bildung einer Vakuole einstülpt. In diese geben spezifische und unspezifische Granula nach ihrer Verschmelzung mit der Vakuolenmembran ihren Inhalt ab [8, 10]. Es entsteht so ein Phygolysosom [10]. Spezifische Granula enthalten als neutrale Proteinasen eine Kollagenase, eine kollagenolytische Metalloproteinase sowie Lysozym, Lactoferin und Vitamin B_{12}-bindendes Protein. Aus azidophilen Granula werden saure Hydrolasen, als neutrale Proteinasen Elastase und Kathepsin G sowie Myeloperoxidase und Lysozym isoliert [7,10]. Unter normalen Bedingungen zeigt sich morphologisch eine Phygozytose als Degranulierung im gefärbten Blutausstrich [15].

Abb. 1:

Ingestion

Membrangebundene Bakterizide

Chemotaxis wird in erster Linie durch die Aktivierung von Serumkomplement ausgelöst [10]. Folgende Einflüsse sind bis heute bekannt [10]:

a) Direkte Umwandlung von C_3 und C_5 durch bakterielle Proteasen, Nekrosen, degranulierende PMN (polymorphnukleäre Granulozyten);

b) Aktivierung des klassischen Komplementsystems durch Antigen-Antikörper-Reaktion oder Anwesenheit von Immunkomplexen;

c) alternative (properdin) Komplementaktivierung durch Mikroorganismen, Endotoxine oder andere polymere Strukturen.

II. PROBLEMSTELLUNG

Die spezifische Granulierung der polymorphkernigen Granulozyten (PMN) kann durch eine unten näher erläuterte Fluoreszenzfärbung (PIC) sichtbar gemacht werden.

Zu einer vollständigen Degranulierung der PMN kommt es laut Suschke im Eiter [15] sowie in Heparinblut, das mit Endotoxin (E. coli oder Salmonellen) einer Sepsis entsprechenden Konzentration inkubiert wird. Weiter fanden Suschke et al. bei septischen Kindern einen erhöhten Anteil an degranulierten PMN (> 30 %).

Diese Arbeit hat die Prüfung der Degranulierung von PMN als zusätzlichen Parameter in der Sicherung der Diagnose "infiziertes Neugeborenes" zum Ziel. Es gilt herauszufinden, ob der erhöhte Anteil degranulierter Zellen durch Geburtsstreß, Geschlecht, vorzeitigen Blasensprung sowie niedrige Apgarwerte beeinflußt wird. Wie sicher ist ein Zusammenhang zwischen erhöhter Anzahl degranulierter Leukozyten (PMN) und Sepsis bzw. Infektion.

Dazu sollten prospektiv von 95 unausgewählten, in der 1. Universitätsfrauenklinik München geborenen Kindern Blutbilder nach der PIC-Fluoreszenzfärbemethode erstellt und ausgewertet werden. Fünf Neugeborene aus anderen Kliniken, die unter dem Verdacht auf Sepsis in die Kinderpoliklinik eingewiesen worden waren, wurden in die Studie einbezogen.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Sammeln und Erstellen der Blutausstriche

1.1 Material

a) EDTA-Blut
b) Resochin
c) Pseudoisocyaninchlorid 5×10^{-4} molare wäßrige Lösung
d) Benzol
e) Fluoreszenzmikroskop

Zu a):
Es wurden ca. 1 bis 2 ml frischen Nabelschnurbluts in ein EDTA-Röhrchen abgefüllt. Das Blut durfte nicht geronnen sein und mußte maximal 1 Stunde nach der Geburt verarbeitet worden sein. Es war unerheblich, ob es sich um arterielles oder venöses Blut handelte. Bei den 5 Neugeborenen aus der Kinderpoliklinik wurde Blut aus einer peripheren Vene genommen.

Zu b):
Die Granulozyten werden mit Resochin behandelt. Es hat membranstabilisierende und lysosomenhemmende Wirkung [16], so daß wir trotz der nachfolgenden Benzolbehandlung weniger Zelltrümmer und dadurch weniger nicht zuordenbare Zellen erhielten als ohne diese Vorbehandlung. Verglichen mit einer Tagesdosis von ca. 250 mg/die/Patient bei chronischer

rheumatischer Arthritis [16] handelt es sich hier um das ca. 25-fache der therapeutischen Dosis.

Zu c):
Pseudoisocyaninchlorid (PIC) ist ein kationischer Farbstoff, der sich an anionische Gruppen bindet. Die Abstände der negativen Ladungen müssen in einem bestimmten Bereich liegen, damit der Farbstoff zu Polymeren aggregiert und somit seine Fluoreszenzeigenschaften erhält. Polyanionen in den Zellen sind DNA, RNA, Glykosaminoglykane, Phospholipide und bestimmte Eiweißkörper [14].

Zu d):
Ohne Benzoleinwirkung zeigen die mit PIC gefärbten Granulozyten fadenförmige grüngelbe Strukturen [12]. Es sind dann keine Granula zu erkennen. Dafür lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff vermehrt in den Lymphozyten und Monozyten an [14]. Nach Inkubation des Bluts mit Benzol verschwindet die PIC-Anlagerung an den Lymphozyten. Jetzt werden aber die Granula der Granulozyten selektiv dargestellt.

Zu e):
Die Blutausstrichpräparate wurden durch ein Fluoreszenzmikroskop "Ortholux II" von Leitz mit einem Ölimmersionsobjektiv 100/1, 30, untersucht, wobei in Auflichtfluoreszenz mit einer Xenon-Hochdrucklampe 75 in Verbindung mit einem Blauregelfilter (BG 12, Leitz) und einem Sperrfilter (TG 510, Leitz) gearbeitet wurde.

1.2 Methode

Jeder Testansatz wurde doppelt ausgeführt.

In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 200 µl EDTA-Blut, 5 µl Resochin, 5 µl Benzol und 200 µl Pseudoisocyaninchloridlösung pipettiert, das Reaktionsgefäß verschlossen und

ca. 1 bis 2 Minuten vorsichtig von Hand mehrfach gewendet. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde je ein Tropfen der Mischung auf zwei saubere Objektträger gebracht und sanft ausgestrichen.

Die mikroskopische Auswertung mußte nicht am gleichen Tag erfolgen, da das gefärbte Präparat lagerstabil war.

1.3 Allgemeine Beschreibung des PIC-gefärbten Blutausstrichs unter dem Mikroskop

Zellkern und Zellplasma zeigen eine grüngelbe Untergrundfluoreszenz. Die leuchtend gelben Granula der Granulozyten sind am einfachsten zu erkennen. Bleibt das Präparat längere Zeit (1 bis 2 Minuten) unverändert im Strahlengang des Mikroskops, wird die Fluoreszenz noch deutlicher. Die Differenzierung der Zellen erfolgt durch die Zellgröße, die Kernform, Kerngröße und Kernstruktur.

Entsprechend der Fragestellung wurden 100 Granulozyten ausgezählt, alle anderen Zellen mußten erkannt, nicht aber ausgezählt werden.

Granulozyten erkennt man leicht am typischen Stab- oder polimorphen Kern, an dem kleinen Kern/Plasma-Verhältnis und vor allem an den leuchtenden Granula.

Als "degranulierte" wurden Zellen gezählt, die 0 bis 5 Granula und die typische Kernform hatten. Bei manchen degranulierten Zellen wirkte der Kern, der immer noch die typische Form aufwies, aufgebläht und zeigte schwarze Vakuolen. Wurde nur ein typischer Granulozytenkern gefunden ohne Plasma, Zellwand oder Granula, wurde er zu den degranulierten gezählt.

Als nicht zuordenbare Zellen werden Strukturen gezählt, die sowohl ein Granulozytenkern als ein Lymphozytenkern oder ein Monozytenkern sein könnten.

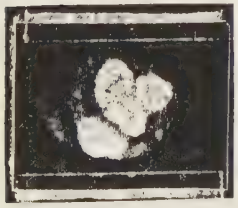
Eosinophile Granulozyten, erkennbar an den leuchtend grünen Granula, wurden zu den granulierten Granulozyten gezählt.

Lymphozyten und Monozyten sind gekennzeichnet durch den großen runden Kern mit angedeuteter Radspeichenstruktur.

Gelegentlich waren auch Normoblasten mit großem nukleolenhaltigem Kern zu erkennen, was bei Neugeborenen keine pathologische Bedeutung hat.

Erythrozyten und Thrombozyten waren deutlich durch Größe und Form von den Zellen der weißen Reihe abzugrenzen.

Abb. 2:



degranulierter PMN

granulierter PMN

2. Klinischer Verlauf

Alle von uns erfaßten (95) Kinder wurden bis zur Entlassung aus der 1. UFK bzw. Kinderpoliklinik (5) unter dem Aspekt

einer möglichen Infektion bzw. Sepsis beobachtet. Dazu wurden folgende Daten notiert:

- Nr. des Kindes,
- Name,
- Geschlecht,
- Geburtsdatum,
- Leukozytenzahl der Mutter zum Zeitpunkt der Geburt,
- Lag ein vorzeitiger Blasensprung vor?
- Wenn ja: wieviel Stunden?
- Art der Geburt (Sectio, Vakuum, Spontan),
- Apgarwerte,
- Geburtsgewicht,
- Leukozytenzahl des Kindes vom gleichen Tag (+ 1 Tag) des PIC-gefärbten Blutausstrichs,
- die Körpertemperatur des Kindes, $< 36°$ oder $> 38°$
- die maximal enthaltene Anzahl der stabkernigen Granulozyten aus dem Differentialblutbild,
- Erregernachweis,
- C-reaktives Protein (CRP positiv $\geq$ 0,8 mg/100 ml),
- Erfolgte eine antibiotische Therapie wg.V.a. Infektion/Sepsis?
- Erfolgte ein Blutaustausch?
- sonstige Besonderheiten im klinischen Verlauf.

Das Kriterium Infektion(V.a. Spesis galt als erfüllt, wenn sich die behandelnden Ärtze zu einer antibiotischen Therapie entschieden hatten. Das war in der Regel aufgrund der Klinik oder anhand anderer eindeutiger obengenannter Symptome der Fall (siehe S. 2 ff).

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden in tabellarischer Form aufgelistet. Von den 100 untersuchten Neugeborenen entwickelten 16 Kinder eine behandlungsbedürftige Infektion, davon wieder 3 eine schwere Sepsis, die einen mehrmaligen Blutaustausch erforderlich machte. Eines dieser Kinder ist verstorben. Ein Kind, das zwar keine Infektion entwickelte, aber vermehrt degranulierte Leukozyten aufwies (falsch positiv) wurde aus organisatorischen Gründen dieser Gruppe hinzugefügt. Dieses Kind starb nach 8 Wochen am plötzlichen Kindstod. 83 Kinder waren unter dem Aspekt Infektion (Sepsis) unauffällig.

3.1 Neugeborene mit Infektion/Sepsis

Geb.Nr.	Name	Geb.-Gew.	Geschl.	Geb.-Datum	Mutter Leukos	Vorz.Blasensprung	Apgar	Kind Leukos	Stabk.	36° 38 Temp.	Erregernachw. Abstrich/Blut	CRP	Fluoresz.-Färbung Gram. Ø	Gram.n.z.	Geburt	Antibiot Therapie	Klin.Verlauf	Verlegt. Entlassen	Zustand
10769	Kr.	3180	m.	13.01.83	181.000	> 48 h	9/10/10	25.000	0	37,6	ß-hem.Strepto. Rotavirer	Ø	80	18	?	vc	+	5 Tage	e.28.10.83	gesund
20575	Ra	1600	w.o	10.11.83	14.000	> 48 h	7/9/in-tubiert	14.700	5	37,0	Ø Nachweis	Ø	56	44	-	sc	-	8 Tage (bis 17.11)	e.04.01.84	
*	Ge	1410	w.o	21.11.83	n.b.	> 48 h	9/10/10	14.700	11	37,6	Staph.albus	Ø	60	36	+	sc	-	5 Tage (bis 24.11.)	e.12.01.84 Verlegt aus Geisenhofer-Klinik wegen V.a. Sepsis	
10852	So	3590	w.o	21.11.83	n.b.	-	4/5/8/10	14.600	20	37,1	Streptokokken	+	77	20	3	sc	+	5 Tage	e.06.12.83	unauff
10878	Jo.	2800	m.	28.11.83	20.400	> 24 h	8/9/10	22.800	0	37,5	Ø	Ø	85	15	0	sp	+	5 Tage V.a.Hodenham.	10.12.83 verl.in v. Haunersche Kinder-Klinik	2 Tage Photo-therapie
10887	R-A I	1600	m.	30.11.83	23.500	> 7 h	6/7/be-atmet	13.200	12	35,8	Ø	+	79	18	3	sp	+	8 Tage	e.04.01.84	
10892	Ga	3630	w.	03.12.83	21.000	> 24 h	7/9/10	13.800	4	37,1	Ø	Ø	58	36	6	sc	+	ab 1. Tag	19.12.83 verl in Poliklinik	n.b
10909	V.W.	3180	w.	12.12.83	n.b.	-	2/3/8	14.600	n.b	n.b	n.b	n.b.	69	25	6	sp.	-	Gesund entlassen, keine Infektion - falsch positiv 1 Tag Phototherapie, verst. 3.2.84 am plötzl. Kindstod		
20651	Fr	1600	m.o	13.12.83	12.200	30 Tage	9/9/10	11.100	14	36,6	Ø	Ø	66	31	3	sp	+	ab 1. Tag, 4 x Blutaust. 2.-4. Tag	29.02.84	
*	Ha	2670	w.o	18.12.83	n.b.	52 h	7/8/in-tubiert	17.000	12	37,5	Ø	Ø	73	21	6	sp	-	17 Tage 1.-16.Tag	09.01.84	
*	Ka	1680	m.o	07.01.84	n.b.	nein	8/9/9 intub.	11.500	21	35,5	Ø	Ø	76	19	-	sc	-	4 Tage	17.02.84	o.B
10023	Ja	2340	m.	06.01.84	64.000	> 24 h	8/9/10	67.100	25	36,5	Ø	+	71	29	-	sp	-	12 Tage	26.01.84	o.B
10032	Za	2135	m.	09.01.84	n.b.	> 24 h	9/10/10	12.500	0	36,0	Ø	Ø	68	24	7	sc	-	5 Tage	01.02.84	o.B. small for date
10034	Br	3500	m	09.01.84	n.b.	> 24 h	2/intub.	14.200	0	36,5	Ø	-	69	30	-	sc	-	6 Tage	19.01.84	o.B
*	We	550	m.o	11.12.83	Kind 5 Wo. alt	n.b	3/2 7	7.300	13	35,-	Enterokokker	-	56	42	-	n.t	seit 1.Tag	5 x Blut-austausch	verst. 01.02.84	
*	v.H.	1300	w.o	18.01.84	n.b.	48 h	3/7/8	5.300	12	36	E. coli	-	39	60	1	sp	-	4 x Blut-austausch	17.04.84	
10912	Ge	3450	w.	13.12.83	n.b.	7 h	9/9/10	23.300		37,-	Ø	Ø	81	19	-	sc	-	5 Tage	19.12.83	o.B

o : kein Nabelschnurblut, sondern Venenpunktionsblut

* Diese Kinder wurden nicht in der 1. UFK München geboren, sie wurden wegen Verdacht auf Sepsis in die Kinderpoliklinik verlegt. Blut zum Zeitpunkt der Sepsis abgenommen

nb nicht bekannt
vc Vacuum
Sc Sectio caesarea
sp Spontangeburt
CRP + CRP positiv
Antibiot + = ... antibiotische Therapie

3. 2 Neugeborene ohne Infektion/Sepsis

Geb.Nr.	Name	Geb.-Gew.	Geschl.	Geb.-Datum	Apgar (1'5'10')	Fluoreszenzfärbung Gran.	Ø Gran.	n.z.	Geburt	Vorz.Blasen-sprung	Klin.Verlauf	Entlassung
10763	Ka	3610	w.	11.10.83	9/10/10	91	3	6	sc	-	o.B,	17.10.83
10767	Co.	3530	m.	12.10.83	9/10/10	89	4	7	sp	-	o.B.	17.10.83'
10778	Ma	3030	m.	17.10.83	7/10/10	94	3	3	vc	-	o.B.	24.10.83
10780	Pr	3680	m.	18.10.83	9/9/10	91	3	6	sc	-	o.B.	31.10.83
10781	Mi	2760	m.	18.10.83	9/10/10	97	0	3	sp	-	o.B.	24.10.83
10783	Si	2670	w.	19.10.83	8/9/10	96	1	3	vc	-	small for date	26.10.83
10786	Ra	4030	w.	20.10.83	8/9/10	96	2	2	sp	-	o.B.	28.10.83
10791	Br	4420	m.	24.10.83	3/4/7 $^{12'}_{10}$	96	2	2	sc	-	o.B.	25.10.83
10792	Ka	3290	m.	25.10.83	9/10/10	98	0	2	sp	35 h	o.B.	31.10.83
10794	Wi	2640	m.	26.10.83	9/10/10	92	2	6	sp	+	o.B.	
10796	Ra	3840	m.	27.10.83	6/8/9	97	1	2	sp	10 h	o.B.	
10797	An	3810	m.	27.10.83	9/10/10	99	0	1	sc	-	o.B.	
10799	Lo I	2500	w.	28.10.83	9/10/10	97	2	1	vc	-	o.B.(38 SSW)	
10800	Lo II		w.	28.10.83	1/3/7/10 $^{20'}$	93	2	5	sp	-	o.B. (38 SSW)	
10806	Ki	3105	w.	31.10.83								
10806	Ki	3105	w.	31.10.83	8/9/10	96	2	2	sp	-	Ösophagotrachealfistel	verlegt
10811	Al	3600	w.	02.11.83	9/10/10	97	1	2	sp	> 24 h	o.B.	
10812	Ob	2400	w.	03.11.83	8/10/10	99	0	1	sp	-	Mißbildung des Darmes	verlegt
10816	We	3280	w.	04.11.83	9/9/10	87	7	6	sp	-	Mißbildung des Darmes	verlegt

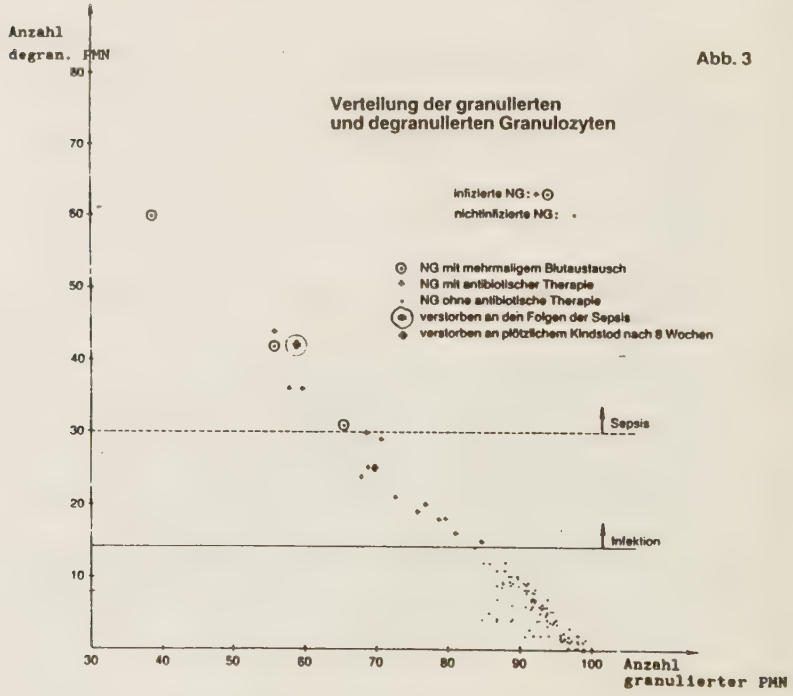
Geb.Nr.	Name	Geb.-Gew.	Geschl.	Geb.-Datum	Apgar (1'5'10')	Fluoreszenzfärbung Gran.	Ø Gran.	n.z.	Geburt	Vorz.Blasen-sprung	Klin.Verlauf	Entlassung
10822	Ta	2880	w.	07.11.83	9/10/10	98	1	1	sp	48 h	o.B.	12.11.83
18021	HW	4030	m.	07.11.83	9/10/10	86	10	4	sp	14 h	o.B.	14.11.83
10825	Gu	3680	w.	09.11.83	9/10/10	91	8	1	sp	+	o.B.	15.11.83
10826	He	3710	m.	10.11.83	9/10/10	93	6	1	sp	-	o.B.	15.11.83
10829	St	2860	w.	11.11.83	9/9/10	84	14	2	sc	-	o.B.	21.11.83
10846	To	3910	w.	17.11.83	9/10/10	89	9	2	sp	-	o.B.	22.11.83
10847	Re	3660	w.	18.11.83	9/10/10	93	6	1	sc	-	o.B.	
1850	Mü	3380	m.	20.11.83	9/10/10	91	8	1	sp	+	o.B.	
10851	Ba	3670	m.	20.11.83	9/10/10	97	3	0	sp	-	o.B.	
10857	Mi	3200	m.	23.11.83	9/10/10	98	2	0	sc	-	o.B.	
10861	Lu	3860	w.	24.11.83	9/9/10	85	12	3	sp	+	o.B.	
10865	He	3580	m.	25.11.83	9/10/10	94	6	0	sp	+	o.B.	
10885	Ju	3500	m.	29.11.83	9/10/10	88	12	0	sp	+	o.B.	
10889	KH	3010	w.	30.11.83	10/10/10	94	5	1	sp	-	o.B.	
10890	Oh	4030	m.	30.11.83	9/10/10	89	9	2	sp	-	o.B.	
10895	Ch I	3200	w.	05.12.83	9/10/10	92	8	0	sc	-	o.B.	
10896	Ch II	3320	w.	05.12.83	9/10/10	89	10	1	sc	-	o.B.	
10899	Cz	2960	w.	07.12.83	9/9/10	92	7	1	vc	+	o.B.	
10900	Re	3000	m.	08.12.83	9/10/10	99	1	0	sp	12 h	o.B.	
10911	Li	2880	w.	13.12.83	9/10/10	91	9	0	sc	5 h	o.B.	
10914	Kl	2400	w.	14.12.83	8/9/10	92	6	2	sc	+	o.B.	
10915	Ko	3330	w.	14.12.83	9/10/10	93	7	0	sp	+	o.B.	
10916	TF	3150	w.	14.12.83	8/9/10	93	4	3	vc	+	o.B.	
10922	Ko	3360	m.	16.12.83	7/8/10	92	8	0	sp	-	o.B.	

Geb.Nr.	Name	Geb.-Gew.	Geschl.	Geb.-Datum	Apgar (1'5'10')	Fluoreszenzfärbung Gran.	Ø Gran.	n.z.	Geburt	Vorz.Blasen-sprung	Klin.Verlauf	Entlassung
10923	Ba	3730	w.	16.12.83	9/10/10	95	5	0	vc	-	o.B.	
10927	Ab	3960	m.	19.12.83	8/9/10	90	10	0	sp	> 48 h	o.B.	
10929	He	3750	m.	19.12.83	9/10/10	95	5	0	sp	-	o.B.	
10930	AP	3110	w.	20.12.83	9/10/10	88	9	3	sp	-	o.B.	
10931	Pe	2660	w.	20.12.83	9/10/10	95	4	1	sp	> 48 h	o.B.	
10932	Ka	3070	w.	20.12.83	9/10/10	91	8	1	sp	> 72 h	o.B.	
20525	Ba	3700	m.	10.10.83	10/10010	85	4	11	sp	-	o.B.	
20527	Ec	3030	w.	13.10.83	9/10/10	89	4	7	sp	-	o.B.	
20538	PC	3380	w.	21.10.83	9/10/10	94	2	4	vc	+	o.B.	
20544	v.K	3600	m.	24.10.83	10/10/10	97	1	2	sc	-	o.B.	
20545	Ki	2890	w.	25.10.83	9/10/10	96	1	3	sc	-	o.B.	
20546	Ke	3610	w.	25.10.83	9/10/10	93	4	3	vc	-	o.B.	
20547	Zw	2800	w.	25.10.83	10/10/10	99	1	0	sp	-	o.B.	
20549	Kl	1100	w.	26.10.83	8/8/9	91	2	7	sp	-	28.Wo.	verlegt, Ø Inf.
20561	St	2800	w.	31.10.83	9/10/10	99	0	1	vc	-	o.B.	
20563	Sch	4220	w.	02.11.83	9/10/10	98	1	1	sp	-	o.B.	
20564	SR	3880	m.	02.11.83	9/9/10	96	2	2	sc	-	o.B.	
20567	Pa	3870	w.	04.11.83	9/10/10	96	2	2	sc	-	o.B.	
20576	RF	4100	w.	10.11.83	10/10/10	88	11	1	vc	-	o.B.	
20585	Lo	3400	m.	17.11.83	9/10/10	92	6	2	sc	> 48 h	o.B.	
20586	Wi	3670	w.	17.11.83	9/9/10	95	4	1	vc	-	o.B.	23.11.83
20587	Re	3830	m.	17.11.83	9/10/10	95	4	1	sp	-	o.B.	
20590	Ra	3260	m.	18.11.83	9/10/10	93	5	2	vc	-	o.B.	

Geb.Nr.	Name	Geb.-Gew.	Geschl.	Geb.-Datum	Apgar (1'5'10')	Fluoreszenzfärbung Gran.	Ø Gran.	n.z.	Geburt	Vorz.Blasen-sprung	Klin.Verlauf	Entlassung
20591	We	3220	m.	18.11.83	9/10/10	95	4	1	sp	+	o.B.	
20592	Ku	3780	m.	18.11.83	9/9/10	96	2	2	vc	+	o.B.	
20598	Ka	3260	m.	20.11.83	9/10/10	89	6	5	sp	+	o.B.	
20606	Si	3710	m.	23.11.83	9/10/10	91	9	0	sp	+	o.B.	
20607	Bo	3220	m.	24.11.83	10/10/10	87	9	4	sc	-	o.B.	
20608	Au	3110	w.	24.11.83	9/10/19	88	9	3	sp	17 h	o.B.	
20615	Er	3890	w.	28.11.83	9/10/10	93	6	1	sp	+	o.B.	
20616	Ha	3580	w.	28.11.83	9/10/10	90	9	1	sp	-	o.B.	
20620	Kr	3610	w.	29.11.83	9/10/10	89	10	1	sp	-	o.B.	
20621	Du	3680	w.	29.11.83	8/9/10	87	11	2	sc	36 h	o.B.	
20625	Hi	3990	m.	30.11.83	9/10/10	89	8	3	sp	-	o.B.	
20635	Be	3535	m.	04.12.83	9/10/10	88	8	4	sc	-	o.B.	
20638	Al	3460	m.	05.12.83	9/10/10	91	9	0	sp	+	o.B.	
20640	Sz	2410	w.	06.12.83	9/10/10	93	5	2	sc	12 h	o.B.	
20643	He	3590	w.	07.12.83	9/10/10	94	4	2	vc	-	o.B.	
20644	Be	3940	w.	07.12.83	9/10/10	87	11	2	sp	-	o.B.	
20655	Ei	2810	w.	15.12.83	9/10/10	86	12	2	sp	-	o.B.	
20660	Ab	3550	m.	19.12.83	9/10/10	92	6	2	sp	-	o.B.	

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Erwartungsgemäß lag der Anteil der degranulierten polymorphkernigen Granulozyten (PMN) in der Gruppe der infizierten Kinder höher (15 bis 60 Degran. pro 100 PMN) als bei den nichtinfizierten Neugeborenen (0 bis 14 Degran. pro 100 PMN) vgl. Abb. 3



Zur Übersicht noch einmal die Streuung der granulierten, der nichtgranulierten PMN und der nicht zuordenbaren Zellen, angegeben pro 100 ausgezählter PMN (Granulozyten)

	Nichtinfizierte Neugeborene	Infizierte Neugeborene	3 Neugeborene mit gesicherter Sepsis
Granulierte PMN	81 bis 99	39 bis 85	39 bis 66
Nichtgranulierte PMN	0 bis 14	15 bis 60	31 bis 60
Nicht zuordenbare Zellen	0 bis 11 (8x>5 von 83)	0 bis 6	1 bis 3

4. Auswertung der Ergebnisse

Entsprechend der Aufgabenstellung dieser Arbeit wurde folgende Gruppeneinteilung vorgenommen:

1) Gruppe A: 17 Kinder, die eine Infektion/Sepsis entwickelt haben, d.h. die im Differentialzellbild $\geq$ 15 degran. PMN haben
   Gruppe B: 83 Kinder, die keine Infektion hatten, d.h., die im Differentialzellbild $<$15 degran. PMN haben

2) Gruppe C: 43 Kinder, die nach vorzeitigem Blasensprung geboren wurden
   Gruppe D: 57 Kinder, die ohne vorzeitigem Blasensprung geboren wurden

3) Gruppe E: 15 Kinder mit niedrigem Apgar, d.h. nach 1', 5', 10' war mindestens ein Wert $<$ 8
   Gruppe F: 85 Kinder mit Apgar nach 1', 5', 10' über 8

4) Gruppe G: 42 Kinder mit erhöhtem Geburtsstreß durch Sectio caesarea oder Vakuum
   Gruppe H: 58 spontan geborene Kinder

5) Gruppe I: 55 w. Neugeborene
   Gruppe K: 45 m. Neugeborene

6) Gruppe L: 6 Kinder mit niedrigem Apgar und vorzeitigem Blasensprung
   Gruppe M: 94 Kinder ohne die Kombination niedriger Apgar und vorzeitiger Blasensprung

7) Gruppe N: 8 Kinder mit einem Geburtsgewicht $<$ 2000 g
   Gruppe O: 92 Kinder mit einem Geburtsgewicht $>$ 2000 g

Nachfolgende Übersicht zeigt, wieviele Kinder aus den Gruppen A bis O jeweils klinisch infiziert bzw. septisch waren, d.h. antibiotisch behandelt wurden, mit Angabe der entsprechenden Prozentzahlen.

	Anzahl pro Gruppe	Davon waren infiziert	%	Gruppenbezeichnung
Gesamt	100	16	16	alle Neugeborenen
Gr. A	17	16	94,1	sept./infektiös (1 Fall falsch pos.)
B	83	0	0	nicht sept.
C	43	11	25,58	vorz. Blasensprung
D	57	5	8,77	kein Blasensprung
E	15	9	60,00	niedriger Apgar
F	85	7	8,24	guter Apgar
G	42	8	19,05	Geburt durch Sectio/Vakuum
H	58	8	13,79	Spontangeburt
I	55	7	12,72	weibl.
K	45	9	20,00	männl.
L	6	5	83,33	niedriger Apgar und vorz. Blasensprung
M	94	12	12,76	
N	8	7	87,5	Geburtsgewicht < 2000 g
O	92	10	10,87	Geburtsgewicht > 2000 g

Gruppenbezogene Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichung (σ) der granulierten und degranulierten PMN-Granulozyten und der nicht zuordenbaren Zellen

	Gruppe	Gruppenbezeichnung	Anzahl n =	Granulierte PMN $\bar{x}$	Granulierte PMN σ	Degranulierte PMN $\bar{x}$	Degranulierte PMN σ	Nicht zuordenbare Zellen $\bar{x}$	Nicht zuordenbare Zellen σ
-		Gesamt	100	88,46	10,85	9,23	10,53	2,3	2,1
A	Neugeb. mit Infektion/ Sepsis nach Differentialzellbild		17	68,41	11,63	28,47	12,05	3,1	2,5
B	Neugeb. ohne Infektion n. Differentialzellbild		83	92,42	4,04	5,41	3,75	2,1	2,0
C	Neugeb. nach vorzeitigem Blasensprung		43	85,44	13,37	12,63	13,06	2,2	2,0
D	Neugeb. ohne vorzeitigen Blasensprung		57	90,74	7,85	6,67	7,25	2,4	2,4
E	Neugeb. mit Apgar < 8		15	75,93	18,01	20,93	18,51	2,8	2,5
F	Neugeb. mit Apgar > 8		85	90,67	7,19	7,16	6,7	2,4	2,0
G	Neugeb. durch Sectio/Vakuum		42	88,36	11,17	9,26	10,67	2,3	2,1
H	Neugeb. durch Spontangeburt		58	88,53	10,70	9,21	10,52	2,5	2,1
I	weibl. Neugeborene		55	88,58	10,60	9,11	10,15	2,0	1,9
K	männl. Neugeborene		45	88,31	11,25	9,38	11,10	2,1	1,9
L	Neugeb. mit Agar < 8 und vorzeit. Blasensprung		6	66,30	20,16	31,5	20,5	1,9	2,3
M	Neugeb. o.Kombination L		94	90,00	8,40	7,8	7,8	2,3	2,1
N	Neugeb. < 2000 g Geb.-Gew.		8	65,40	16,30	31,5	18,7	3,2	2,7
O	Neugeb. > 2000 g Geb.-Gew.		92	90,46	7,5	7,4	6,7	2,0	2,3

Die zugehörigen grafischen Darstellungen zeigen Abb. 4 und Abb. 5.

Abb. 4

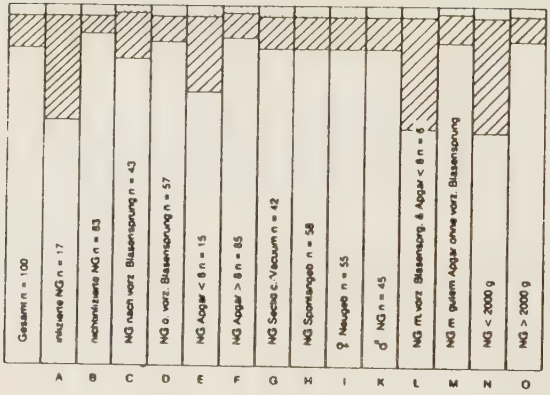
Anteil der granulierten [ ]

Anteil der nicht granulierten ▨

Anteil der nicht zuordenbaren Zellen [ ]

von 100 ausgezählten Granulozyten

Angabe der Mittelwerte gruppenbezogen:



Anteil der granulierten

Anteil der nicht granulierten

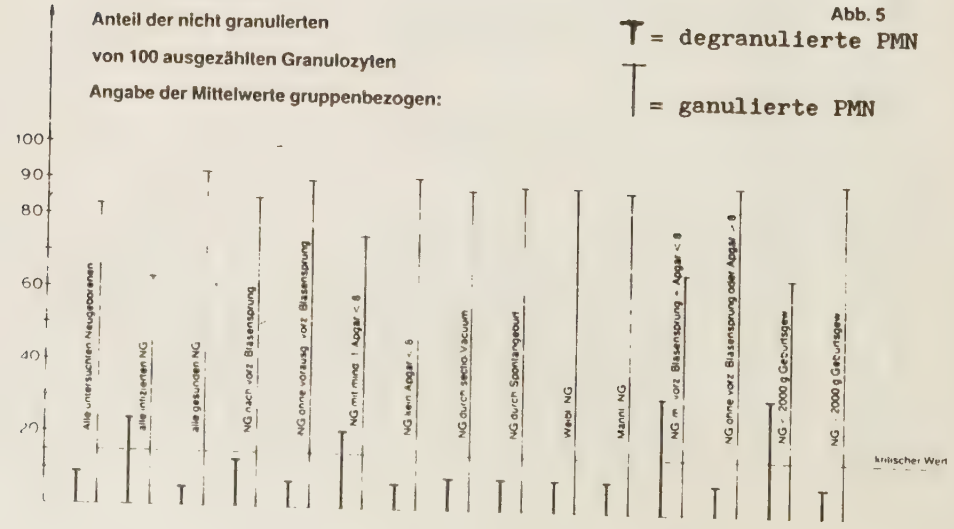
von 100 ausgezählten Granulozyten

Angabe der Mittelwerte gruppenbezogen:

Abb. 5

T = degranulierte PMN

T = ganulierte PMN



Statistische Berechnungen:

Erlaubt ist die Ermittlung von Mittelwerten und Standardabweichungen von Stichproben aus einer Grundgesamtheit, die einer Gauß'schen Normalverteilung entspricht.

Zur Überprüfung dient der Test auf Normalverteilung nach David, Pearson und Stephens [19].

Test auf Normalverteilung nach David, Pearson und Stephens [19]:

Formel $a = \frac{R}{S_x}$

a = Prüfgröße
R = Variationsbreite
S_x = Standardabweichung der Einzelwerte

Anteil der granulierten Granulozyten in %

R: kleinster Anteil 39 %
größter Anteil 99 %

$R = (99 - 39)\ \% = 60\ \%$

$S_x = 10{,}85\ \%$

$$a = \frac{60\ \%}{10{,}85\ \%} = 5{,}53\ \%$$

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\ \%$ (= 0,05), bei einer Fallzahl n = 100 ist unsere Prüfgröße a = 5,53 größer als die untere Grenze der Tabelle von 4,31 und kleiner als die obere Grenze von 6,53. Daraus folgt: Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\ \%$ entstammt die Probe einer normal verteilten Grundgesamtheit.

Die Angabe von Mittelwert und Standardabweichung sind also zulässig. Das gilt auch für Gruppen mit geringer Fallzahl, wie nachfolgende Berechnungen zeigen.

Test nach David, Pearson und Stephens für Gruppen mit geringer Fallzahl

Gruppe A: Infizierte Neugeborene (klinisch)

n = 16

Kritische Werte bei α = 0,05

Untere Grenze 3,01

Obere Grenze 4,24

R_a = 85 - 39 = 46

S_a = 11,6

a = 46/11,6 = 3,96; liegt zwischen unterer und oberer Grenze.

Gruppe E: Niedriger Apgar

n = 15

Kritischer Wert α = 0,05

Untere Grenze 2,97

Obere Grenze 4,17

R_e = 97 - 39 = 58

S_e = 18,01

a = 58/18,01 = 3,22; liegt zwischen unterer und oberer Grenze

Gruppe L: Niedriger Apgar und vorzeitiger Blasensprung

n = 6

Untere Grenze 2,28

Obere Grenze 3,012

R_L = 97 - 39 = 58

S_L = 20,16

a = 2,87; Bedingung erfüllt

Gruppe N: Geburtsgewicht < 2000 g

n = 8

Untere Grenze 2,50

Obere Grenze 3,399

R_n = 91 - 39 = 52

S_n = 16,3

a = 52/16,3 = 3,19; Bedingung erfüllt.

Um signifikante Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen festzustellen, wurde der U-Test nach Wilcoxon, MANN Whitney angewandt [19] (χ^2-Test = Chi-Quadrat-Test).

Wegen der relativ hohen Stichprobenanzahl (> 40) wurde das Programm "Kruskal-Wallis one way analysis of variance test", (BMDP3S), am ISB (Institut für Statistik und Biomathematik) der Ludwig-Maximilians-Universität angewandt.
Die Ergebnisse werden unter 4.1. bis 4.6. erläutert. Hier zur Übersicht:

Gruppen A:B	p = 0,0000	infiziert/nicht infiziert
C:D	p = 0,0403	Vorz.Blasensprung/kein vorz. Blasensprung
E:F	p = 0,0048	Schlechter Apgar/guter Apgar
G:H	p = 0,5710	Sectio/Spontangeburt
I:K	p = 0,6010	weibl./männl.
L:M	p = 0,0004	Niedriger Apgar + vorz. Blasensprung/guter Apgar oder kein vorz. Blasensprung

Signifikanz ist gegeben ab $p \leq 0,05$

4.1 Vergleich der Differentialzellbilder von infizierten Neugeborenen mit Neugeborenen ohne Infektion

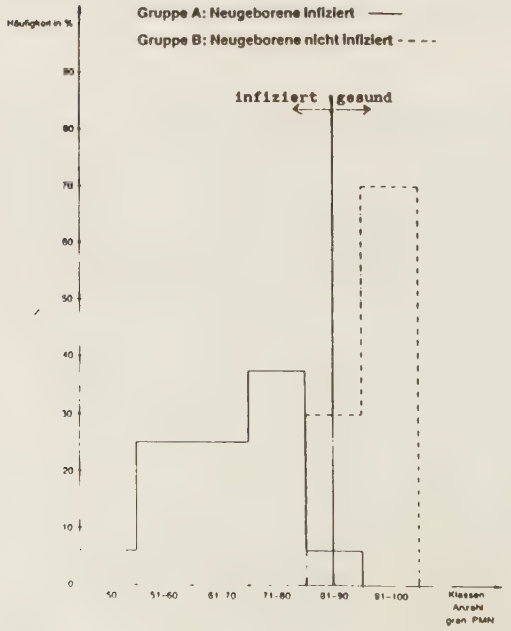
	Anzahl	Granulierte PMN Mittelwert	Granulierte PMN Standardabweichung	Degranulierte PMN Mittelwert	Degranulierte PMN Standardabweichung
Infizierte/sept.Neugeb. nach Diff.-Zellbild	17	68,4	11,6	28,5	12,0
Nichtinfizierte Neugeb. nach Diff.-Zellbild	83	92,4	4,0	5,4	3,7

Ein signifikanter Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Neugeborenen anhand der Anzahl granulierter PMN wurde nach "Kruskal-Wallis, One way analysis of variance test" mit p = 0,000 ermittelt.

Von 17 der Gruppe "infizierte bzw. septische Neugeborene" war ein Kind falsch positiv, d. h. trotz erhöhter Zahl an degranulierter PMN (25 %), war das Kind nicht krank. Darum wurde hier kein CRP bestimmt. Falsch negativ war kein Fall. Von 16 Neugeborenen mit mehr als 15 degranulierter PMN waren 10 Kinder CRP(-) negativ, 5 Kinder CRP(+) positiv, bei einem Kind fehlt dieser Laborwert.

Die Verteilung der granulierten PMN in Prozent auf die Klassen "Anzahl der granulierten PMN" für jede Gruppe gibt Abb. 6 wieder.

Abb. 6



Die Überprüfung von Sensitivität, Spezifität und Treffsicherheit[19] ergab, daß das Differentialzellbild der Granulozyten zur Sicherung der Diagnose "Infektion/Sepsis" eine Methode mit hoher Spezifität, Sensitivität und Treffsicherheit ist.

Berechnung:

$$\text{Sensitivität} = \frac{rP}{(rP + fN)} = \frac{16}{16+0} = 1$$

$$\text{Spezifität} = \frac{rN}{(rN + fP)} = \frac{83}{83+1} = 0{,}988$$

$$\text{Treffsicherheit} = \frac{rP + rN}{n} = \frac{16 + 83}{100} = 0{,}99$$

16 = rP = richtig positiv (septisch)
83 = rN = richtig negativ (gesund)
1 = fP = falsch positiv (gesund)
0 = fN = falsch negativ (septisch)
rP + fN = alle Kranken
rN + fP = alle Gesunden

4.2 Vergleich der Differentialzellbilder von Neugeborenen nach vorzeitigem Blasensprung mit Neugeborenen ohne vorzeitigem Blasensprung

Folgende Werte wurden ermittelt:

	Anzahl	Granulierte PMN Mittel-wert	Granulierte PMN Standardab-weichung	Degranulierte PMN Mittel-wert	Degranulierte PMN Standardab-weichung
Neugeb. nach vorz. Blasen-sprung	43	85,4	13,4	12,6	13,1
Neugeb. ohne vorz.Blasen-sprung	57	90,7	7,9	6,7	7,3

Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen wurde mit p = 0,0403 ermittelt.

d.h.: Neugeborene nach vorzeitigem Blasensprung entwickelten signifikant häufiger eine Infektion/Sepsis als Neugeborene ohne vorzeitigen Blasensprung.

Die prozentuale Verteilung der granulierten PMN auf die in Klassen gerechnete Anzahl wird gruppenbezogen in Abb. 7 gezeigt.

Abb. 7

4.3 Vergleich der Differentialzellbilder von Neugeborenen mit niedrigem Apgarwert und Neugeborenen mit gutem Apgarwert

Definition: Als niedriger Apgarwert wurde gewertet, wenn mindestens ein Wert unter 8 lag, ermittelt nach 1 Minute, 5 Minuten und 10 Minuten.

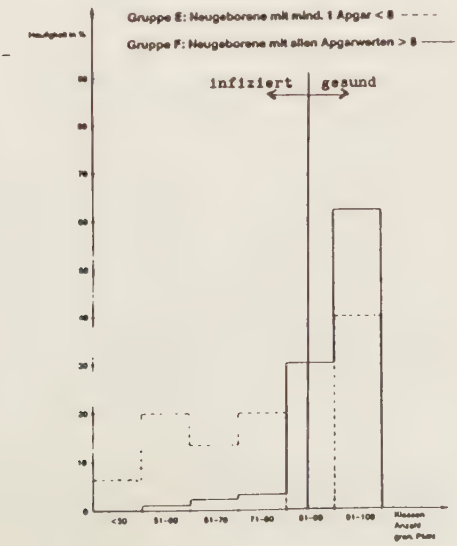
	Anzahl	Granulierte PMN Mittelwert	Granulierte PMN Standardabweichung	Degranulierte PMN Mittelwert	Degranulierte PMN Standardabweichung
Neugeb. mit niedrigem Apgar 8	15	75,9	18,0	20,9	18,5
Neugeb. mit gutem Apgar 8	85	90,7	7,2	7,2	6,7

Der signifikante Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen wurde mit $p = 0{,}0048$ ermittelt.

d.h.: Neugeborene mit mindestens einem Apgarwert < 8 bekamen signifikant häufiger eine Infektion/Sepsis als Neugeborene, deren Apgarwert alle über 7 lagen.

Abb. 8 zeigt für jede Gruppe die prozentuale Verteilung der Fälle auf die Klassen "Anzahl granulierte PMN".

Abb. 8



4.4 Vergleich der Differentialzellbilder von Geburten per sectio caesarea oder Vakuum mit Spontangeburten

Es ergaben sich folgende Werte:

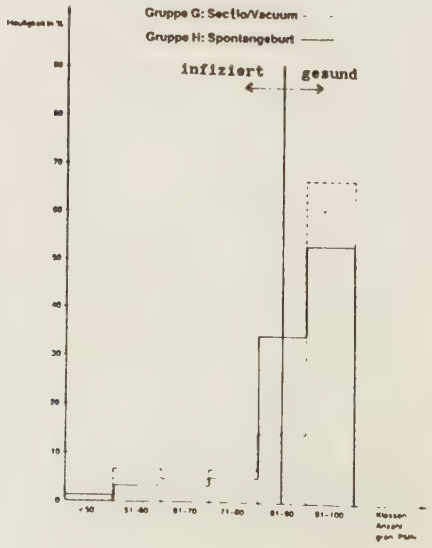
	Anzahl	Granulierte PMN Mittelwert	Granulierte PMN Standardabweichung	Degranulierte PMN Mittelwert	Degranulierte PMN Standardabweichung
Neugeb. nach Sectio bzw. Vakuum	42	88,4	11,2	9,3	10,7
Neugeb. spontan geboren	58	88,5	10,7	9,2	10,5

Ein signifikanter Unterschied wurde, ausgehend von einer üblicherweise angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05, nicht gefunden, da p = 0,5710 und somit größer wird.

d.h.: Der Geburtsstreß bei Entbindung durch sectio caesarea oder Vakuumextraktion führt gegenüber Spontangeburten nicht signifikant häufiger zu Infektion/Sepsis.

Der prozentuale Verteilung der Fälle auf die nach Klassen geordnete Anzahl granulierter PMN zeigt Abb.9.

Abb. 9



4.5 Vergleich der Differentialzellbilder von weiblichen mit männlichen Neugeborenen

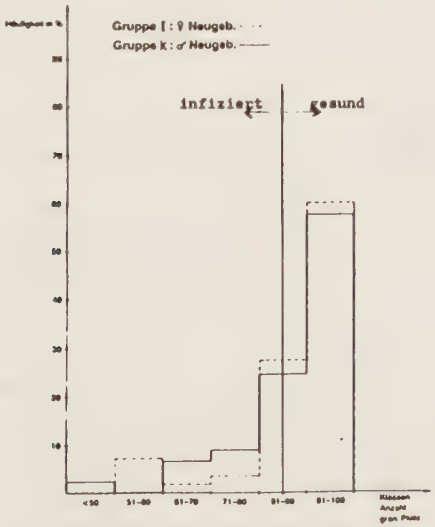
	Anzahl	Granulierte PMN Mittel-wert	Granulierte PMN Standardab-weichung	Degranulierte PMN Mittel-wert	Degranulierte PMN Standard-abweichung
weibl. Neugeb.	55	88,6	10,6	9,1	10,2
männl. Neugeb.	45	88,3	11,25	9,4	11,1

Auch hier konnte wie in Punkt 4.4 bei p = 0,6010 kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden.

d.h.: Das Geschlecht der Neugeborenen hat keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich Infektion/Sepsis ergeben.

Die Verteilung der Fälle auf die zu Klassen zusammengefaßte Anzahl granulierter PMN geht aus Abb. 10 hervor.

Abb. 10



4.6 Vergleich der Differentialzellbilder von Neugeborenen nach vorzeitigem Blasensprung und niedrigem Apgar mit Neugeborenen ohne diese Kombination

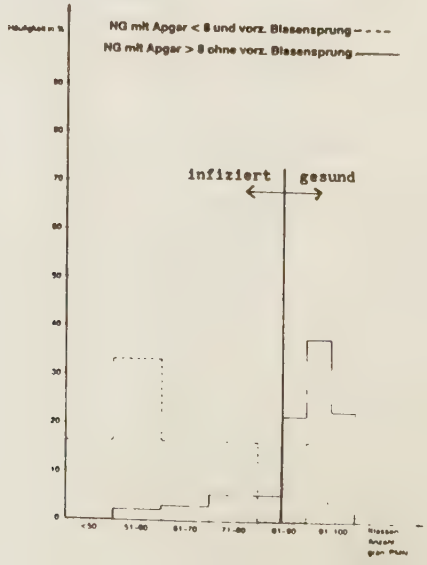
	Anzahl	Granulierte PMN Mittelwert	Granulierte PMN Standardabweichung	Degranulierte PMN Mittelwert	Degranulierte PMN Standardabweichung
Neugeb. nach vorzeitigem Blasensprung u. niedrigem Apgar	6	66,3	20,2	31,5	20,5
Neugeb. ohne die o.g. Kombination	94	90,0	8,4	7,8	7,8

Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen konnte mit p = 0,0004 nachgewiesen werden.

d.h.: Neugeborene mit mindestens einem Apgarwert unter 8 und Geburt nach vorzeitigem Blasensprung entwickeln signifikant häufiger eine Infektion/Sepsis als andere Neugeborene.

Die Verteilung der granulierten PMN in Prozent auf die Klassen "Anzahl der granulierten PMN" für jede Gruppe gibt Abb. 11 wieder.

Abb. 11



4.7 Vergleich der Differentialzellbilder nach Geburtsgewichtsklassen

Geburtsgewicht	Anzahl d.Fälle	Anzahl davon septisch	%	Anzahl granul.	Anzahl degranul.
bis 1000 g	1	1	100	56	42
1000 2000 g	7	6	85,7	65,37	31,5
2000 2500 g	5	2	40,0	84,6	12,8
2500 g	87	8	9,2	89,9	7,5

Zum Vergleich mit Werten aus der Literatur, wonach 60 % aller Frühgeborenen (< 2500 g) eine Sepsis entwickeln [2]:

Klassen	Anzahl	Davon septisch		%	
< 2500 g	13 (9)	9	(5)	69,2	(55,5)
> 2500 g	87 (86)	8	(7)	9,2	(8,44)

Nimmt man die fünf bekannt septischen Kinder aus der Kinderpoliklinik heraus, ergeben sich für die Gruppe der unausgesuchten Neugeborenen aus der I. Universitätsfrauenklinik die in der obigen Tabelle in Klammern angegebenen Werte.

Mittelwert und Standardabweichung für Geburtsgewichtsklassen

	Anzahl	Granul. PMN $\bar{x}$	Granul. PMN σ	Degranul. PMN $\bar{x}$	Degranul. PMN σ
< 2000 g	8	65,37	16,28	31,5	18,16
> 2000 g	92	90,46	7,54	7,36	6,7

d.h.: Die Werte entsprechen annähernd denen aus der Gegenüberstellung: infizierte Neugeb. gegenüber Gesunden (4.1), Neugeb. mit niedrigem Apgar und vorz. Blasensprung gegenüber allen anderen Neugeborenen (4.6), was nicht verwunderlich ist, da diese Kinder in den Gruppen "Infizierte Ng." und "NG mit niedrigem Apgar" zum Großteil enthalten sind.

Ebenso zeigt der prozentuale Anteil der septisch gewordenen (87,5 %) Kinder (vgl. S. 17) eine Korrelation zwischen niedrigem Geburtsgewicht und Erkrankungshäufigkeit.

5. Fehler

5.1 Zufällige Fehler

Alle Präparate wurden pro Kind doppelt angefertigt und ausgezählt.

20 Präparate wurden nochmals an verschiedenen Tagen ausgezählt. Hier lag der Fehler bei ca. 1 bis 3 %.

Alle Präparate mit mehr als 10 degranulierten Zellen wurden von verschiedenen Untersuchern kontrolliert. Hier lag die Differenz bei 1 bis 5 %.

Gerechnet wurde mit den Mittelwerten.

Die Größe der Stichproben dürfte mit 100 insgesamt ausreichend gewesen sein.

Lediglich die Gruppe der infizierten Kinder mit n = 16 müßte unter anderem, um zu quantitativen Aussagen zu kommen, weiter beobachtet werden (vgl. Diskussion)

5.2 Systematischer Fehler

Bei der Blutabnahme können die ersten Fehler gemacht werden. Das Blut darf nicht aus der Nabelschnur gequetscht werden. Es darf nicht geronnen oder teilweise geronnen sein, da sonst ein Teil der zu beurteilenden Zellen durch Gerinnsel abgefangen wird. Es sollte so frisch wie möglich verarbeitet werden, um nachträglich degranulierte Zellen ausschließen zu können.

Durch die Benzolbehandlung bei der PIC-Färbemethode werden die Zellmembranen brüchig. Darum führt zu starkes Schütteln zu künstlicher Degranulation, ebenso wie unsachgemäßes, zu kräftiges Ausstreichen. Der falsch positive Fall Nr. 10909 ist wahrscheinlich so zu erklären.

Auf der Suche nach möglicherweise septischen Neugeborenen mußte bei 8 von 17 Fällen Venenpunktionsblut genommen werden. Hier könnte die unterschiedliche Methode zu Fehlern geführt haben, die sich aber nicht feststellen ließen.

IV. Diskussion

Normalerweise erfüllen die in den Granula der PMN enthaltenen lysosomalen Enzyme ihre biologische Funktion innerhalb der Zelle, in der sie phagozytiertes Material abbauen[8,9].

Endotoxine (g(-)) und Exotoxine (g(+)) setzen zusammen mit anderen Faktoren (Antigen-Antikörper-Komplexen, Komplementfaktoren, aggregiertem IgG oder opsonierten Partikeln) aus PMN-Granulozyten Elastase, Kollagenase und andere lysosomale Proteinasen frei[8,9,10]. Duswald, Fritz et al. konnten zeigen, daß die extrazellulär gefundene Elastase-Konzentration sich proportional dem Sepsisverlauf verhält und nach Genesung wieder auf einen normalen minimalen Ausgangswert absinkt[8,7].

Folgende Gegenüberstellung sei zur Veranschaulichung erlaubt:

Elastase-Werte (µg/ml)[7]		Anzahl degran. PMN (%)	
Normalpatienten ohne Infektion	86,5 ± 25,5	5,4 ± 3,8	Neugeborene ohne Infektion
Patienten nach überstandener postoperativer Sepsis	266,1 ± 35,4	25,0 ± 8,8	Neugeborene mit Infektion ohne schwere Sepsis
Patienten mit anhaltender postoperativer Sepsis	571,0 ± 41,6	44,3 ± 14,6	Neugeborene mit Sepsis

Diese Vorgänge korrelieren mit den morphologischen Veränderungen der nach Suschke mit PIC gefärbten Granulozyten. Sie erlauben zwar keine quantitativen, jedoch ausreichen quali- Aussagen über das Vorliegen einer Infektion bzw. Sepsis. Verlaufsbeobachtungen kombiniert mit PIC-Blutbildprofilen und eventuell Leukozytenelastase-Bestimmungen könnten qualitative Aussagen ermöglichen, waren aber nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Hier ist die Blutabnahme nicht zu einem definierten Zeitpunkt der Sepsis (Anfang, Höhepunkt, Ende) erfolgt, sondern routinemäßig postpartal (95) oder von hierbei nicht erfaßten Neugeborenen zum Zeitpunkt des Sepsisverdachts (5). Der für diese Patienten ermittelte Mittelwert an degranulierten PMN mit $\bar{x}$ = 34,12 ($\pm$ o 14,4) liegt deutlich über den entsprechenden Werten für Kinder, deren PIC-Blutbild postpartal erstellt wurde, die aber zu dem Zeitpunkt noch keine Sepsis hatten; $\bar{x}$ = 23,44, σ = 7,2.
Eine weiterführende Arbeit, die Normbereich, Beachtungsbereich, Sepsisbereich angeben könnte, wäre vorteilhaft.

Von allen 100 untersuchten Kindern wurden 16, von den 95 unausgesuchten Neugeborenen (I. Universitätsfrauenklinik) wurden 11 infektiös. Das sind wesentlich mehr als in der Literatur[2] angegeben werden, nämlich : ca. 10 - 16 Sepsen auf 1000 Neugeborene und Säuglinge. Der Grund liegt in dem für eine zentrale Universitätsklinik typischen (risikoreicheren) komplikationsträchtigeren Krankengut.

Entsprechend den bisherigen Erfahrungen[5, 1] zeigte sich auch in unserem Patientengut, daß einige Umstände als Risikofaktoren für die Entwicklung einer behandlungsbedürftigen Infektion gelten. So wurden von Neugeborenen nach vorzeitigem Blasensprung 25 % (vgl. 16 % von allen), mit niedrigem Apgar (mind. ein Wert $\leq$ 8) 60 %, mit niedrigem Apgar und nach vorzeitigem Blasensprung 83 % sowie Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 2000 g 87 % infektiös.

Dagegen haben sowohl die Art der Geburt, ob Sectio caesarea, Vakuum oder Spontangeburt, als auch das Geschlecht keine Auswirkung auf die Sepsishäufigkeit.

Folgende kritische Werte wurden gefunden:

Ab einer Anzahl von 15 degranulierten PMN pro 100 ausgezählter Granulozyten ist mit einer Infektion, ab 30 mit

einer Sepsis zu rechnen. Auch diese Werte lassen sich gut vereinbaren mit den von Duswald ermittelten Elastasekonzentrationen, die bei anhaltender Sepsis etwa doppelt so hoch sind wie nach überstandener Sepsis[7] (vgl.: S. 33).

V. MÖGLICHER STELLENWERT DER DIFFERENTIALZELLBILDER BEI DER ÜBERWACHUNG NEUGEBORENER

1. Differentialdiagnose Infektion/keine Infektion

Berücksichtigt man die bisher üblichen Laborparameter (Anz. d. stabkernigen Granulozyten im Differentialbb, CRP, Blutkultur; vgl. I. 3.), die sensitiv für eine Sepsis gelten, findet man folgendes:
Die Blutkultur kann in der Regel nur einmal angelegt werden, da in den häufigsten Fällen sofort eine antibiotische Therapie eingeleitet wird. Dabei ist nur in 73 %[2] aller Fälle ein Erregernachweis möglich. In unseren Untersuchungen, in die zusätzlich Rachen-, Nabel- und andere Abstriche einbezogen wurden, konnte nur bei 6 von 16 infektiösen Kindern positiv ein Erreger nachgewiesen werden.

Ebenso verhielt es sich mit der Bestimmung des CRP, das lt. Literatur[18, 2] in 85 % aller gesicherten Sepsisfälle positiv sein soll. Nach unseren Auswertungen war dies bei 5 von 16 Kindern der Fall, was 31,25 % entspricht. Davon hatten wiederum nur 4 Kinder gleichzeitig eine positive Blutkultur.

Betrachtet man den Anteil der stabkernigen Granulozyten, der bei einer Sepsis bei 15 bis 25 % liegen soll[2], fanden wir bei unseren 3 Neugeborenen mit gesicherter Sepsis maximal 13 Stäbe. Bei diesen waren wiederum nur 2 CRP positiv und andere 2 hatten einen positiven Erregernachweis.

Mehr als 15 wurden bei 3 von 16 infektiösen Kindern gefunden. Im Vergleich dazu gab das PIC-gefärbte Differential-

zellbild der Granulozyten nur einen falsch positiven Fall. Dazu ist noch anzumerken, daß dieses Kind zunächst gesund entlassen wurde, aber nach 8 Wochen am plötzlichen Kindstod verstorben ist. Eine Interpretation dieses Zusammenhangs ist jetzt nicht möglich. Sollte es einmal zu einer routinemäßigen Auswertung von Differentialgranulozytenzellbildern aller Neugeborenen kommen, würde vielleicht ein Zusammenhang nachprüfbar.

2. Vorteile der Methode "Differentialzellbilder"

Die oben beschriebene Anfertigung und Auswertung PIC-gefärbter Granulozytenzellbilder läßt sich in jedem entsprechend (Fluoreszenzmethode) ausgerüsteten Labor schnell durchführen. Spätestens nach 1 Stunde hätte man das Ergebnis. Zudem benötigt man nur wenig Blut (200 µl), womit auch eine engmaschigere Kontrolle, bei Sepsisverdacht beispielsweise zumutbar wäre. Ein weiterer Vorteil ist darin zu sehen, daß diese Methode unabhängig von einer bereits eingeleiteten antibiotischen Therapie ist. Die Einführung als Routinekontrolle bei allen Neugeborenen wäre durchaus sinnvoll.

3. Nachteile der Methode

Der einzige Nachteil liegt in der Verwendung von Benzol wegen seiner gesundheitsschädigenden Wirkung auf das Laborpersonal. Vielleicht läßt sich in Zukunft ein geeigneter Lipidlöser finden. Außerdem ist die Anzahl der nicht zuordenbaren Zellen mit 2,3 % (= Mittelwert) zu hoch.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Granulierung der Granulozyten kann nach Benzoleinwirkung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pseudoisocyaninchlorid (PIC) sichtbar gemacht werden. Bei Infektionen bzw. Sepsis kommt es zur Degranulierung von Granulozyten und damit zur Freisetzung lysosomaler Enzyme, die wiederum wesentlich für den Sepsisverlauf sind.

Es wurden von 95 unausgewählten Neugeborenen sowie von 5 Neugeborenen mit Sepsisverdacht PIC-gefärbte Blutbilder angefertigt und ein Differentialzellbild der polymorphkernigen (PMN) Granulozyten erstellt. Gleichzeitig wurde der klinische Verlauf bis zur Entlassung aus der Klinik dokumentiert. Dabei fanden wir 16 infektiöse Kinder mit mehr als 15 % degranulierten PMN-Zellen, davon drei mit einer schweren Sepsis mit mehr als 30 % degranulierten Zellen, einen falsch positiven Fall mit 24 % degranulierten Granulozyten und 83 nicht infektiöse Kinder mit 5,4 $\pm$ 3,8 % (Mittelwert) degranulierten PMN-Zellen.

Praktische Bedeutung gewinnt das Differentialzellbild der PMN-Granulozyten für die Früherkennung bzw. Differentialdiagnose einer Neugeboreneninfektion/-Sepsis.

VII. LITERATUR

1) Belohradsky, B.H. und W. Marget: Neugeborgeneninfektionen, Pädiatrie in Klinik und Praxis, Bd. 1, Fischer/Thieme, Stuttgart-New-York, 1978

2) Diekmann, L. und J. Kotzur: Sepsis im Neugeborenen- und Säuglingsalter, Klin. Pädiat. 188, 135 bis 145 (1976)

3) Emmrich, P., W. Baumann und H. Stopfkuchen: Fulminante Verlaufsformen der Sepsis des Neugeborenen und jungen Säuglings, Mschr. Kinderheilk. 125, 437-438 (1977)

4) v. Harnack G.-A. und Mitarb.: Kinderheilkunde, 5te Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York, 1980

5) Töllner, U.: Sepsis-Score, pädiat. praxis 28, 1 bis 9 (1983)

6) Alistair G.S. Philip, MB, FRCP(E), DCH and Jean R. Hewitt, BS: Early diagnosis of neonatal sepsis, Pediatrics, Vol. 65, No. 5 (5(1980)

7) K.H. Duswald, M. Jochum u. H. Fritz: Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie und Pathobiochemie der Sepsis und des sept. Schocks, Intense Care 2/82

8) K.H. Duswald: Zur Pathobiologie der Leukozyten-Elastase, G-I-T Verlag Ernst Giebeler, Darmstadt (1983)

9) Klebanoff, S.J., R.A. Clark: The neutrophil : function and clinical disorders, North-Holland, Amsterdam (1978)

10) Smolen, J.E., G. Weissmann: The granulocyte : Metabolic properties and mechanisms of lysosomal enzyme release. In: K. Havemann, A. Janoff: Neutral proteases of human polymorphnuclear leuctocytes, Urban u. Schwarzenberg Verlag, Baltimore, Munich (1978), S. 56

11) Gschwind, K.: Zur Struktur von Pseudoisocyanin-Aggregaten, Diss. TU München (1974)

12) Schöberl, H.: Färbeverhalten mit Pseudoisocyanchlorid von Leukozyten bei Normalpersonen und Patienten mit leukämischen Erkrankungen, Diss. LMU, München (1982)

13) Suschke H.J., Gschwind G., Rhode G.: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis saurer Mukopolysaccharide in menschlichen Blut- und Knochenmarkszellen, Klin. Wschr. 54, 289 bis 290 (1976)

14) Suschke H.J., Bender-Götze, Ch., Fink U., Ledderose G., Rüter M., Schöberl H., Unterscheidung leukämischer und nichtleukämischer Zellen im Blutausstrich durch Fluoreszenzfärbung mit Pseudoisocyanin, in münchen (19)

15) Stacheter M.: Das Differentialzellbild der Synovialflüssigkeit, Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung, Diss. LMU München (1983)

16) Kuschinsky G., Lüllmann H.: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1978)

17) Storm, W.: Beurteilung positiver Blutkulturen bei intensiv pflegebedürftigen Neugeborenen, pädiat. prax. 27, 1 bis 10 (1982/83)

18) Sabel, K.-G., Wadsworth, Ch.: C-Reactive Proteine (CRP) in Early Diagnosis of Neonatal Septicemia, Acta Paediatr. Scand 68: 825-831 (1979)

19) Ramm B., Hofmann G.: Biomathematik, Enke Verlag, Stuttgart (1982)

LEBENSLAUF

Name:	Anna Elisabeth (Annelie) Drewes, geb. von Rüden
Geburtsdaten:	05. Juni 1949 in Oesdorf, Nordrhein-Westfalen
Eltern:	Dipl.-Landwirt Dr. Friedrich von Rüden, Organistin Anni von Rüden, geb. Baumeister
Ehemann:	Patentanwalt Bernhard Drewes, geb. 24. März 1949, verheiratet seit dem 27. Januar 1971
Kinder:	Max Drewes, geb. 14. November 1976 Sarah Drewes, geb. 22. März 1979
Schulabschluß:	1968 Abitur am Städt. Gymnasium Niedermarsberg
Beruf:	1968 bis 1974 Programmiererin, Systemanalytikerin
Studium:	Mathematik (3 Semester) an der TU München Medizin SS 1974 bis SS 1983 Physikum: August 1978 1. Staatsexamen: März 1980 2. Staatsexamen: März 1982 3. Staatsexamen: April 1983 Approbation erteilt am 20. Mai 1983